

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND

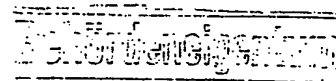


DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift  
⑪ DE 36 14359 A1

⑤① Int. Cl. 4:  
G01 N 21/64

②① Aktenzeichen: P 36 14 359.6  
②② Anmeldetag: 28. 4. 86  
④③ Offenlegungstag: 5. 2. 87



DE 3614359 A1

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①  
26.07.85 DD WP G 01 N/279 007 7

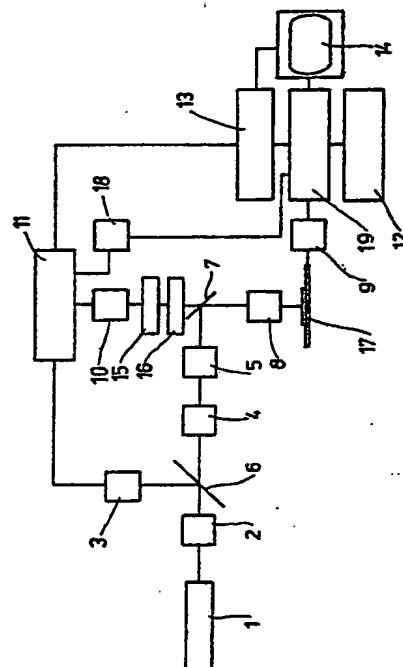
⑦① Anmelder:  
Jenoptik Jena GmbH, DDR 6900 Jena, DD

⑦② Erfinder:  
Gröbler, Bernhard, Dipl.-Phys., DDR 6902  
Jena-Lobeda, DD

⑤④ Anordnung zur bildlichen Darstellung und Analyse von Fluoreszenzsignalen

Die Erfindung betrifft eine Anordnung zur bildlichen Darstellung und Analyse von Fluoreszenzsignalen und kann zur Analyse des Abklingverhaltens von Impulsen bei der Fluorometrie angewandt werden.

Die Aufgabe, eine Anordnung zur quantitativen Fluorometrie anzugeben, mit der Bilder der räumlichen Verteilung des Abklingverhaltens in Mikroobjekten im ns-Bereich erzeugt und dargestellt werden können, wird gelöst, indem der beispielsweise durch gepulstes Laserlicht hervorgerufene Fluoreszenzimpuls durch schnell reagierende elektronische Mittel in seiner Gesamtheit oder Teilen davon weiterverarbeitet wird. Die Fluoreszenzenergie kann in Speicherelementen abgesetzt und zur bildlichen Darstellung benutzt werden. Das Objekt wird durch elektronische Steuermittel rasterförmig bewegt, und der Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden.



DE 3614359 A1

## Patentansprüche

1. Anordnung zur bildlichen Darstellung und quantitativen Analyse von Fluoreszenzsignalen, bei der beispielsweise mittels gepulstem Laserlicht ein Präparat zur Fluoreszenz angeregt und die entstehenden Fluoreszenzimpulse von einer fotoelektrischen Einrichtung analysiert und registriert werden und das Präparat relativ zum Anregungslicht verschiebbar ist, gekennzeichnet dadurch, daß durch geeignete und an sich bekannte Mittel ein gesamter Fluoreszenzimpuls oder wählbare, zeitlich begrenzte Teile davon zur Weiterverarbeitung vorhanden sind, daß die zeitlich begrenzten Teile durch Wahl der Zeitpunkte des Beginns und Endes jedes Teiles festgelegt sind, daß eine Speicherung der Gesamtenergie der Fluoreszenzimpulse oder der Energie eines oder mehrerer der zeitlich begrenzten Teile davon oder durch geeignete Operationen aus den Energiebeträgen abgeleitete Kenngrößen in Elementen eines Bildspeichers ausgeführt ist, daß die Speicherelemente den bestrahlten Präparateorten paarweise zugeordnet sind, daß durch Präparateverschiebung alle gewünschten Orte des Präparates auswertbar und die Messungen wiederholbar sind, daß der Inhalt des Bildspeichers anschließend bildlich dargestellt ist.
2. Anordnung nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß eine für alle gewünschten Orte des Präparates gleiche, wählbare Anzahl von Anregungsimpulsen gleichartig ausgewertet und die jedem Ort des Präparates entsprechenden Summen oder Mittelwerte der Fluoreszenzenergien oder der Teile davon zur Weiterverarbeitung vorgesehen sind.
3. Anordnung nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß für die bildliche Darstellung der Fluoreszenzenergien ein Farbdisplay vorgesehen ist und die gespeicherten Werte zur Pseudocolorierung des Bildes dienen.
4. Anordnung nach Anspruch 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß zur Verbesserung der Farbsättigung und des Signal-Rausch-Verhältnisses die Bildbeiträge der Meßzyklen akkumuliert und fortlaufend auf dem Display dargestellt sind.
5. Anordnung nach Anspruch 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß zusätzlich die Anregungsimpulse zur Weiterverarbeitung vorgesehen sind.
6. Anordnung nach Anspruch 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß zusätzlich das durch das Präparat hindurchgehende und/oder das von diesem Präparat gestreute Licht zur Weiterverarbeitung vorgesehen ist.
7. Anordnung nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß anstelle des Bildspeichers ein lang nachleuchtendes Display Verwendung findet.

## Beschreibung

Die Erfindung kann zur bildlichen Darstellung und Analyse von Fluoreszenzsignalen, insbesondere des Abklingverhaltens solcher Signale, angewandt werden, die z. B. bei der Erforschung der Bindung von Farbstoffen an Substanzen in biologischen Zellen benutzt werden.

Einrichtungen zur Fluoreszenzanalyse von Mikroobjekten, bei denen das gesamte Objekt vom Erregerstrahlungsstrom andauernd getroffen wird, sind bekannt. Dabei wird mittels der vom Objekt ausgehenden Fluoreszenzstrahlung ein Bild der Objektstruktur ent-

worfen, das üblicherweise mit Okularen betrachtet oder auch fotometrisch untersucht werden kann. Diese Lösungen haben den Nachteil, daß die Fluoreszenzintensität während der Untersuchung nachläßt und nacheinander gemessene Werte nicht unmittelbar vergleichbar sind. Es besteht keine Möglichkeit einer Kurzzeitanalyse des Fluoreszenzvorganges (Beyer, H., Handbuch der Mikroskopie, Berlin, 1977). Eine Kurzzeitanalyse ist notwendig, wenn die zu untersuchenden Objekte eine Fluoreszenzstrahlung abgeben, die sich durch wellenlängendispersive Mittel nicht ausreichend von der Fluoreszenzstrahlung der Umgebung trennen läßt, wie in DE-PS 28 18 841 C2 beschrieben.

Bekannt sind weiter Einrichtungen zur Kurzzeitfluoreszenzanalyse kleinster Objektstellen, bei denen ein äußerst kurzer Lichtimpuls durch ein Mikroobjektiv auf die Probe fokussiert und der von der bestrahlten Objektstelle ausgehende Fluoreszenzimpuls mittels schneller lichtelektrischer Empfänger in seinem zeitlichen Verlauf registriert und anschließend grafisch dargestellt und/oder mathematisch analysiert wird, wie in Docchio, F., et al., Journ. Microsc. 134 (1984) 151 beschrieben. Diese Einrichtungen sind frei von sog. fading und bieten die Möglichkeit zeitaufgelöster Fluorometrie. Durch wiederholte Anwendung ist es mit den genannten Einrichtungen zwar prinzipiell möglich, einen Überblick über die räumliche Verteilung von Substanzen mit zeitlich verschiedener Fluoreszenzantwort zu erhalten, aber nur mit großem Zeitaufwand.

Zur Behebung dieser Schwierigkeit wird in DE-PS 30 37 983 C2 vorgeschlagen, ein Empfängerdiodenarray in der Abtastrichtung in der Bildebene eines Scanning-Mikroskopes zu verwenden. Das gewährleistet wiederum nur eine geringe Zeitaufklärung und kann nur bei relativ langsam abklingender Fluoreszenz eingesetzt werden, demnach nicht bei den meisten wichtigen Eigenfluoreszenzen biologischer Zellen oder sonstigen üblichen Fluorochromen.

Die in US-PS 42 84 897 beschriebene Lösung schränkt das fading zwar weitgehend ein, enthält aber keine Mittel zur zeitlichen Analyse des Fluoreszenzvorganges.

Ziel der Erfindung ist es, eine Anordnung zur quantitativen Fluorometrie anzugeben, mit der unter Zeiteinsparung die Nachteile des Standes der Technik minimiert werden.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Anordnung zur quantitativen Fluorometrie anzugeben, mit der es möglich ist, Bilder der räumlichen Verteilung des Fluoreszenzabklingverhaltens in Mikroobjekten im ns-Bereich zu erzeugen und eine Darstellungsform für die räumliche Verteilung dieses Abklingverhaltens zu schaffen, die eine schnelle Gewinnung der Bilder erlaubt und bestimmte Objektdetails auf Grund der charakteristischen Impulse hervorhebt oder stetige Änderungen der Impulse in Abhängigkeit vom Ort eindeutig interpretierbar dargestellt werden.

Diese Aufgabe löst eine Anordnung zur bildlichen Darstellung und Analyse von Fluoreszenzsignalen erfindungsgemäß dadurch, daß der vorteilhafterweise von einem Laser ausgehende Impuls anregender Strahlung durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert und diese Probe mittels geeigneter Mittel, z. B. gemäß einem Raster, verschoben werden kann. Das von dem bestrahlten Ort der Probe ausgehende Fluoreszenzlicht wird durch eine schnell reagierende fotoelektrische Einrichtung registriert, wobei diese Einrichtung elektronische Tor-

ak-Kamera enthalten kann, mit denen der gesamte Fluoreszenzimpuls oder bestimmte, zeitlich begrenzte Teile davon, weiterverarbeitet werden und die genannten Teile durch Wahl der Zeitpunkte ihres Beginns und Endes festgelegt werden können.

Weiterhin werden die Energie des Fluoreszenzimpulses oder eines oder mehrerer der erwähnten Teile oder davon abgeleitete Kenngrößen als Zahlenwerte oder geeignete physikalische Größen in Speicherelementen gespeichert, die dem bestrahlten Fleck der Probe zugeordnet sind, und daß der so beschriebene Ablauf der Messung für eine Schar Punkte des zu untersuchenden Objektfeldes, z. B. gemäß einem Raster, wiederholt werden kann, so daß schließlich die bildliche Darstellung bestimmter zeitlicher Fluoreszenzunterschiede des Probenfeldes möglich wird.

Die erwähnten, zeitlich begrenzten Fluoreszenzimpulsanteile werden so gewählt und/oder mit arithmetischen und/oder logischen Operatoren derart verknüpft, daß auf der bildlichen Darstellung Objektpunkte mit speziellem Abklingverhalten ihrer Fluoreszenz hervorgehoben werden, wobei eine spezielle Art der genannten Verknüpfung darin bestehen kann, daß die Energiewerte der Fluoreszenzimpulse bzw. der Teile davon zur Steuerung der Grundfarben eines Farbmonitors genutzt werden können.

Durch mehrfache Wiederholung des Gesamtvorganges und fortlaufende Mittelung der Werte in den Speicherelementen wird das Signal-Rausch-Verhältnis günstig beeinflusst.

Die Erfindung soll anhand von Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigt

Fig. 1 den schematischen Aufbau der Anordnung,

Fig. 2 den Verlauf von Erreger- und Fluoreszenzimpuls.

In Fig. 1 sendet ein Laser 1 eine Folge von kurzen Lichtimpulsen aus, deren Wellenlänge zur Fluoreszenzanregung in Objekten des Präparates 17 geeignet ist. Die Impulse passieren eine Anpassungsoptik 2 und gelangen durch den Strahlteiler 6, das Filter 4 und die Anpassungsoptik 5, den Strahlteiler 7 und das Mikroskopobjektiv 8 auf das Präparat 17, das sich in der Brennebene des Mikroskopobjektives 8 befindet. Von der getroffenen Objektstelle des Präparates 17 werden entsprechende Fluoreszenzimpulse ausgesandt, die nach dem Mikroskopobjektiv 8 den Strahlteiler 7, eine Optikkombination 16 und ein Filter 15 durchsetzen und auf einen schnell reagierenden Strahlungsempfänger 10 treffen. Die ausgelösten elektrischen Impulse am Strahlungsempfänger 10 werden einem Impulsanalysator 11 zugeführt. Außerdem erhält der Impulsanalysator 11 noch elektrische Impulse von der schnellen Fotodiode 3, die vom Strahlteiler 6 einen Teil jedes Anregungsimpulses empfängt.

Durch Bedienelemente am Impulsanalysator 11, durch den Computer 19 mit seinem Bedienpult 12 und die Zähl- und Steuereinheit 18 kann der Impulsanalysator 11 auf verschiedene Betriebsarten eingestellt werden, die es gestatten, entweder die Energie des gesamten Fluoreszenzimpulses oder die Energie eines oder mehrerer Zeitabschnitte dieses Impulses weiterzuverarbeiten. Beginn und Ende des jeweiligen Impulsteiles ist durch einstellbare Zeitintervalle, die vom Eintreffen des elektrischen Impulses von der Fotodiode 3 bis zum gewünschten Zeitpunkt verstreichen, wählbar.

Der Impulsanalysator 11 kann auch so eingestellt werden, daß die weiterzuverarbeitenden Energieanteile, die einer wählbaren, stets gleichen Anzahl aufeinander-

folgender Anregungsimpulse entsprechen, vor der Weiterverarbeitung gemittelt werden.

Die zu einem Präparat-Pixel gehörenden gemittelten oder ungemittelten Fluoreszenzennergieanteile werden als Zahlenwerte in einem oder mehreren Elementen des Speichers 13 abgesetzt, das bzw. die dem Pixel zugeordnet sind. Je nach dem gewählten Arbeitsregime wird stets dann mittels der vom Computer 19 gesteuerten Präparateverschiebungseinrichtung 9 das Präparat 17 um einen Schritt verschoben, wenn von einem Pixel ein oder eine stets gleiche Anzahl von aufeinanderfolgenden Fluoreszenzimpulsen ausgewertet wurde.

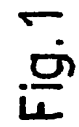
Die Größe und Richtung der vom Präparat 17 auszuführenden Schritte ist durch den Computer 19 beliebig steuerbar und erfolgt vorteilhaft nach einem Raster. So wird das gesamte gewünschte Objektfeld des Präparates 17 ausgewertet und die entsprechenden Fluoreszenzennergiewerte im Speicher 13 abgesetzt.

Parallel zu oder anschließend an diesen Vorgang wird der Inhalt des Speichers 13 auf dem Display 14 bildlich dargestellt. Dabei erlaubt es die Arbeitsweise des Impulsanalysators 11, des Computers 19, des Speichers 13 und des Displays 14, daß wahlweise ein Bild des untersuchten Präparateteils gemäß der Gesamtenergie der Fluoreszenzimpulse oder gemäß der zeitlichen Energieanteile oder gemäß mathematischer Verknüpfungen derselben dargestellt werden kann. Insbesondere können die Energieanteile oder deren Verknüpfungen auf dem Display 14 zur Pseudocolorierung des Bildes verwendet werden.

In Fig. 2 ist ein möglicher Fall des Verlaufes von Erregerimpuls 20, der durch den elektrischen Impuls von der Fotodiode 3 vertreten wird, und Fluoreszenzimpuls 21 sowie einem der Impulsanteile 24, der um das Zeitintervall 22 später beginnt als der Erregerimpuls 20 und um das Zeitintervall 23 später, als der Erregerimpuls 20 beginnt, endet.

- Leerseite -

**36 14 359**  
**G 01 N 21/64**  
**28. April 1986**  
**5. Februar 1987**



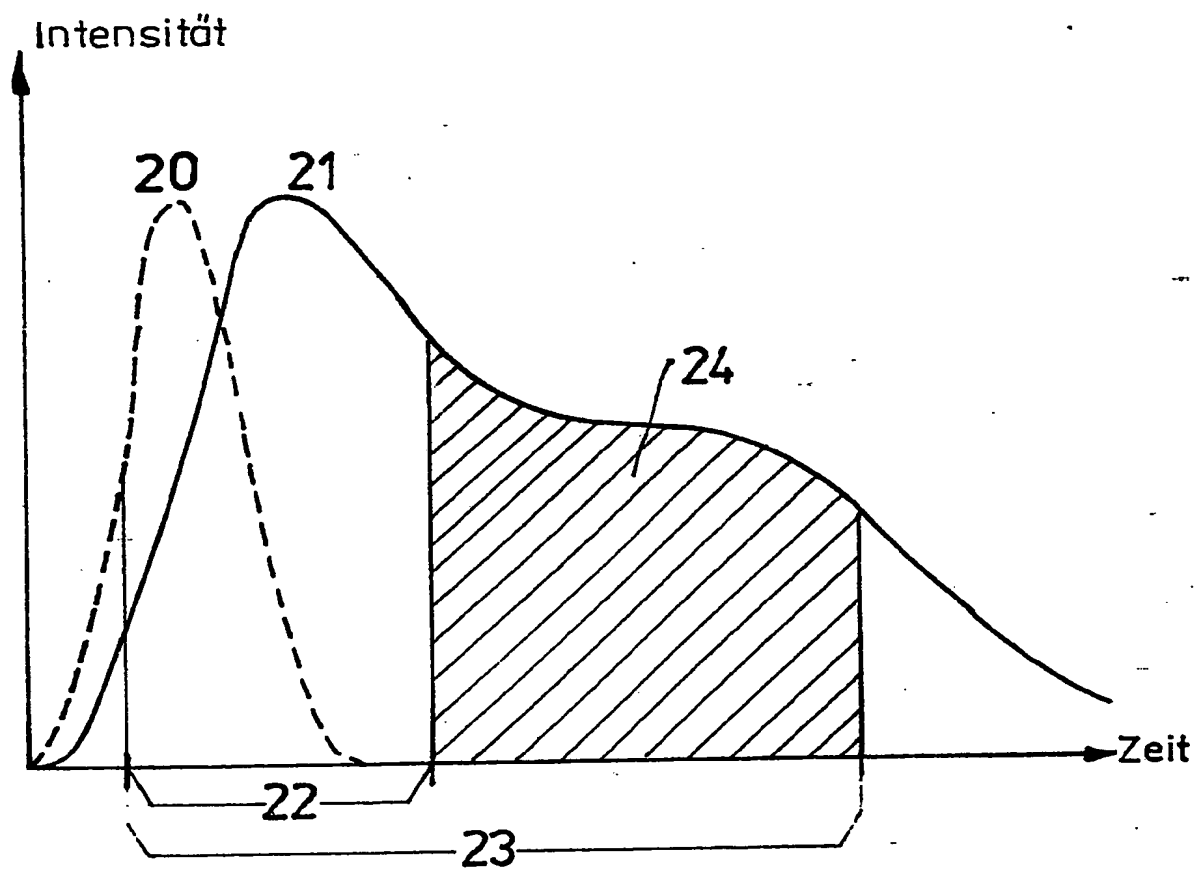


Fig. 2

ORIGINAL INSPECTED